

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
8. Juli 2004 (08.07.2004)

PCT

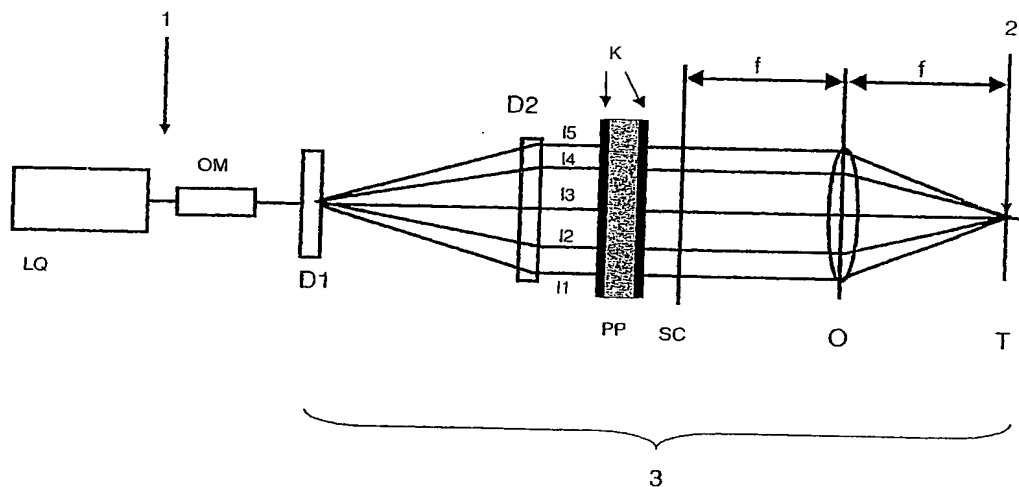
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/057401 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G02B 21/00**
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/013476
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
29. November 2003 (29.11.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
102 59 443.0 19. Dezember 2002 (19.12.2002) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **CARL ZEISS JENA GMBH** [DE/DE]; Carl-Zeiss-  
Promenade 10, 07745 Jena (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WOLLESCHEFSKY, Ralf** [DE/DE]; An der Promenade 3, 99510 Schöten (DE).  
**KEMPE, Michael** [DE/DE]; Am Mönchenberge 8, 07751  
Kunitz (DE).
- (74) Anwalt: **HAMPE, Holger**; Carl Zeiss Jena GmbH, Carl-  
Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,  
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,  
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND ARRANGEMENT FOR OPTICAL EXAMINATION OR PROCESSING OF A SAMPLE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND ANORDNUNG ZUR OPTISCHEN UNTERSUCHUNG UND/ODER BEARBEITUNG  
EINER PROBE



(57) Abstract: The invention relates to a method and an arrangement for optical examination or processing of a sample, comprising means for generating an illumination light, a post-arranged means for spectral splitting of the illumination light to give spatially separate spectral components, means for rendering the split illumination light parallel, means for focussing the illumination light on or in the sample, whereby the spectral components are superimposed and means for detecting the sample light, preferably with means for generating a short-duration pulsed illumination light, post-arranged means for spectral splitting of the illumination light to generate spatially separate spectral components with pulse lengths greater than the pulse lengths of the illumination light source, whereby the above are recombined again in the sample.

(57) Zusammenfassung: Verfahren und Anordnung zur optischen Untersuchung und/ oder Bearbeitung einer Probe, mit Mitteln zur Erzeugung eines Beleuchtungslichtes, diesen nachgeordneten Mitteln zur spektralen Aufspaltung des Beleuchtungslichtes zur Erzeugung räumlich getrennter Spektralkomponenten, Mitteln zur Parallelisierung des aufgespaltenen Beleuchtungslichtes.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/057401 A1

7652 PET



*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

Mitteln zur Fokussierung des Beleuchtungslichtes auf oder in die Probe, wobei die Spektralkomponenten überlagert werden sowie Mitteln zur Detektion des Probenlichtes, vorteilhaft mit Mitteln zur Erzeugung eines kurzpulsigen Beleuchtungslichtes, diesen nachgeordneten Mitteln zur spektralen Aufspaltung des Beleuchtungslichtes zur Erzeugung räumlich getrennter Spektralkomponenten mit Pulslängen, die grösser sind als die Pulslänge der Beleuchtungslichtquelle, wobei diese in der Probe wieder vereinigt werden.

**Verfahren und Anordnung zur optischen Untersuchung und / oder Bearbeitung einer Probe**

**Stand der Technik:**

In der Mikroskopie zur Untersuchung von z.B. biologischen Präparaten werden  
5 heutzutage immer häufiger nichtlineare Kontraste, wie die Multi-Photonen Absorption  
oder die Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG) eingesetzt. Um die zur Anregung  
von nichtlinearen Effekten nötige Energie bereitzustellen, ist es vorteilhaft Kurzpuls-laser  
einzusetzen. Dabei sollte die Pulsspitzenleistung möglichst groß und damit die  
Pulslänge am Ort der Probe möglichst klein sein, um eine gleichzeitige Schädigung der  
10 Präparate zu verhindern. Kurzpuls-laser liefern beispielsweise Lichtimpulse mit einer  
Pulslänge von einigen 10fs bei einer Repetitionsrate von mehreren 10 MHz. Sie haben  
dadurch den Vorteil äußerst hohe Pulsspitzenenergien bei gleichzeitig geringer mittlerer  
Leistung zu emittieren.

Nachteilig ist, dass sich die kurzen Pulse auf dem Weg durch das Mikroskop zur Probe  
15 durch die Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD) verändern – im Normalfall werden  
sie länger.

Zur Kompensation der Pulsverlängerung wurden in entsprechende Anordnungen  
vorgesprochen (DE19827139A1, DE19744302A1, DE19930532A1).

Die beschriebenen Vorrichtungen sind im wesentlichen nur zur Kompensation der  
20 Dispersion 2. Ordnung geeignet. Somit sind sie nicht ausreichend falls auch  
Dispersionen höherer Ordnungen auftreten, d.h. die Pulsverlängerung kann dann nicht  
komplett kompensiert werden. In den z.B. biologischen Präparaten ist jedoch mit nicht  
vorher bestimmbar-Dispersionen höherer Ordnungen zu rechnen. Weiterhin treten in  
den optischen Komponenten in einem Mikroskop Dispersionen höherer Ordnung auf.

25 Somit ist es mit den herkömmlichen Techniken nicht möglich, optimale Bedingungen  
zur Anregung der nichtlinearen Kontraste schaffen.

Ein weiterer Nachteil ist, dass durch die hohen Pulsspitzenleistungen bzw.

Pulsspitzenintensitäten die Proben außerhalb des Bereichs in dem eine  
Probenwechselwirkung gewünscht ist geschädigt bzw. die Optiken der

30 Mikroskopanordnung beschädigt werden können.

In konventionellen Fluoreszenzmikroskopie werden verschiedene Farbstoffe zur  
spezifischen Markierung von biologischen Präparaten eingesetzt. Diese Farbstoffe  
werden anschließend mit unterschiedlichen Lichtwellenlängen angeregt. Durch den

Einsatz der Multiphotonen-Anregung erfolgt bei solchen Präparaten meist eine simultane Anregung der verschiedenen Farbstoffe. Dies ist einerseits ein Vorteil, da man nur noch eine Lichtwellenlänge zur Anregung benötigt. Andererseits ist es von Nachteil, wenn sich die Emissionswellenlängenbänder der einzelnen Farbstoffe  
5 überlagern, da die Farbstoffe dann nicht mehr spektral getrennt werden können.

Die Nachteile sollen durch die Erfindung behoben werden.

Dies erfolgt durch die in den unabhängigen Ansprüchen angegebenen Mittel und Verfahrensschritte.

Vorteilhafte Ausgestaltungen sind Gegenstand der Unteransprüche.

10 Durch die Erfindung ist es vorteilhaft möglich, über einen Rückkopplungsprozess die Amplituden- und/oder Phasenmodulation der Lichtpulse in einer Fourierebene so zu variieren, dass eine entsprechende Messgröße (z.B. das Zweiphotonen-Fluoreszenzsignal) in einem Mikroskop optimiert wird. Weiterhin ist es mit den erfindungsgemäßen Anordnungen möglich, hohe Pulsspitzenleistungen am Ort der  
15 Probe zu erzielen ohne hierdurch schädliche Effekte, in der Mikroskopanordnung bzw. in Schichten außerhalb des Fokalbereiches in dem die Messgröße angeregt werden soll, verursacht werden. Durch die Anordnung kann auch eine variable Anpassung des Strahlquerschnitts zur optimalen Füllung der in die Probe fokussierenden Optik erfolgen.

20

### ***Beschreibung der Erfindung***

In Fig. 1 ist das Grundprinzip der Erfindung schematisch dargestellt.

Eine Kurzpulslichtquelle LQ sendet kohärentes (Kurzpulslaser) oder zeitlich inkohärentes Licht (Breitband oder Weißlichtquelle) aus, das, vorteilhaft kollimiert, auf  
25 ein erstes dispersives Element D1, beispielsweise ein Prisma oder Gitter gelangt. Das dispersive Element zerlegt die ankommende Strahlung um ihre Mittenwellenlänge spektral, so dass die spektralen Komponenten, hier als I1-I5 dargestellt, jedes Lichtpulses räumlich getrennt werden.

Ein zweites dispersives Element D2 weist eine im wesentlichen gleiche Charakteristik  
30 bezüglich der spektralen Zerlegung auf, ist aber zum ersten Element D1 räumlich entgegengesetzt angeordnet.

Hierdurch verläuft das Licht wieder parallel (kollimiert), jedoch immer noch spektral räumlich zerlegt und durchläuft eine Anordnung zur scannenden optischen Abtastung

einer Probe T (Fig.1) , die hier nur schematisch mit einem X/Y Scanner SC und einer Objektivlinse O angedeutet ist. Die Scanner X/Y liegen hierbei in der Nähe der rückwärtigen Pupille des Objektivs O. Dies ist durch die Bezeichnung der Brennweite  $f$  der Objektivs schematisch angedeutet.

Über das Objektiv wird die Strahlung wieder in Richtung der Probe T gebündelt. Das heißt, dass die spektrale Zerlegung im Fokus des Objektivs O wieder aufgehoben wird und der Lichtpuls der Lichtquelle LQ dadurch rekonstruiert wird.

- 10 Zwischen dem Element D1 und dem Objekt T liegen somit keine kurzen Pulse vor, da die Spektralkomponenten nicht räumlich überlappen. Die Länge der Lichtpulse im Bereich zwischen D1 und O hängt von der räumlich spektralen Auflösung der Aufspaltung der Lichtpulse ab.
- 15 Ein Vorteil einer derartigen Anordnung ist es, dass die von den Lichtpulsen durchlaufene Optik zumindest im Bereich 3 nicht vor Beschädigung durch sehr kurze Pulse bzw. durch sehr hohe Pulsspitzenleistungen geschützt werden muss. Es treten die hohen Pulsspitzenleistungen erst unmittelbar am Ort der Probenwechselwirkung, d.h. im Fokalebereich, in dem auch beispielsweise eine nichtlineare
- 20 Probenwechselwirkung (z.B. Zweiphotonen-Fluoreszenzanregung) mit einem Farbstoff durchgeführt wird, auf. Hierdurch werden die Proben vor Schädigung zumindest außerhalb des Bereichs in dem die Probenwechselwirkung durchgeführt werden soll geschützt. Zum anderen kann eine bessere Korrektur der optischen Anordnung zur Abbildung in die Probe erzielt werden, da eine größere Vielfalt der verwendbaren
- 25 Materialien und optischen Schichten vorhanden ist. Somit können auch Kosten gespart werden.

- Ein weiterer Vorteil ist, dass Mittel zur räumlich unterschiedlichen Beeinflussung der Lichtpulse wie beispielsweise Phasenplatten PP im kollimierten Strahlengang,
- 30 beispielsweise vor dem Scanner SC eingefügt werden können. Die Phasenplatten weisen in bestimmten Bereichen eine unterschiedliche Dicke entlang ihres Querschnitts zur Änderung der optischen Brechzahl auf, so dass bestimmte Spektralkomponenten in Bezug zu anderen Spektralkomponenten zeitlich verzögert werden. Hierdurch können die Gruppengeschwindigkeitsdispersion GVD der Optiken im gesamten Strahlengang von

der Lichtquelle LQ bis zur Probe T einschließlich zusätzlicher Glasmaterialien OM kompensiert werden.

Durch Verwendung mehrerer derartiger Phasenplatten unterschiedlicher Form, können die Lichtpulse bezüglich ihrer Form beeinflusst werden. Die Einstellung der Phasen der räumlich separierten Anteile zueinander kann auch flexibel beispielsweise mit einem Spatial Light Modulator SLM erfolgen, der einzeln ansteuerbare Elemente (vorteilhaft in Matrixform) aufweist und anstatt oder zusätzlich in der Nähe von PP im Strahlengang angeordnet wird.

Ein weiterer Vorteil ist, dass die Elemente D1 und D2 zur variablen Strahlaufweitung verwendet werden können. Hierzu wird der Abstand der Elemente D1 und D2 verändert, wodurch sich eine vom Abstand der Elemente (siehe auch Fig. 3a, 4a, 6a – S1 und S2) je nach Ausführung der Elemente D1 und D2 zumindest in einer Raumrichtung abhängige Strahlaufweitung ergibt.

Vorzugsweise im parallelen Strahlengang, vorteilhaft zwischen D2 und Scanner SC Kann über einen Strahlteiler mindestens eine weitere Lichtquelle, beispielsweise zur parallelen Erfassung des Reflektionslichtes der Probe durch unten beschriebene weitere Detektoren, eingekoppelt werden.

In Fig.2 ist eine Anordnung wie in einem Laser- Scanning- Mikroskop dargestellt, mit Pinholeoptik PO, Pinhole PH, Detektoren DE1 und DE2 sowie einem ersten dichroitischen Strahlteiler (Hauptfarbteiler) MDB 1 zur Auskopplung des Detektionslichts aus dem Beleuchtungsstrahlengang nach den Scannern SC (descannte Detektion), einer Scanoptik SO, einem Zwischenbild ZB, einer Tubuslinse sowie einem weiteren Detektionsstrahlengang zur nicht- descannten Detektion DE3. Die Ausspiegelung des nicht descannten Detektionslichts erfolgt hierbei über einen weiteren dichroitischen Strahlteiler MDB2. Die zusätzliche Aufteilung des Detektionslichts in mehrere Detektionskanäle kann durch die Verwendung eines weiteren dichroitischen Strahlteilers beispielsweise für zwei Kanäle DE1 und DE2 mit MDB3 erfolgen. Vor den Detektoren werden zur Messung eines Fluoreszenzsignals entsprechende Filter vorteilhaft zwischen den MDB und den DE eingeschwenkt.

P ist hierbei die Pupille des Mikroskopobjektivs O. In einer zu dieser Ebene konjugierten weiteren Pupillenebene der Mikroskopanordnung befinden sich die Scanner SC zum Abrastern der Probe.

Die Einheit zur spektral räumlichen Aufspaltung der Spektralkomponenten der Lichtquelle DISP besteht aus den bereits oben erläuterten Elementen D1 und D2. Sie befindet sich im kollimierten Strahlengang vorteilhaft zwischen Lichtquelle und dem MDB1 und bewirkt neben der spektral räumlichen Aufspaltung der Spektralkomponenten der Lichtpulse eine Strahlaufweitung der Lichtquelle zur optimalen Füllung der Pupille P. Die Einheit DISP wirkt im allgemeinen zusätzlich wie eine Prechirpeinheit, d.h. sie kann zur Kompensation zumindest eines Anteils der GVD der Mikroskopoptik eingesetzt werden. Die Einstellbarkeit der Kompensation ist anhand von Fig.11 dargestellt.

Eine Kompensation der verbleibenden GVD kann mit Hilfe der Phasenplatte PP ( siehe auch weiter oben) im kollimierten Strahlengang, beispielsweise vor dem Scanner SC, erfolgen, die unterschiedliche Dicke über ihren Querschnitt aufweist, z.B.eine Krümmung mindestens einer Seitenfläche der Platte oder beider Seitenflächen oder eine Keilform aufweist.

Die Krümmung ist so eingestellt, dass die verbleibende GVD der Optiken im Strahlengang von Lichtquelle LQ bis Probe T kompensiert wird und somit bandbreitenbegrenzte Pulslängen durch zeitliche Verzögerung einzelner Spektralkomponenten der Lichtpulse, d.h. die kürzest möglichen Pulslängen am Ort der Probe auftreten.

Durch Verwendung mehrerer derartiger Phasenplatten, mit unterschiedlichen Krümmungen, kann der Puls bezüglich seiner Form weiter beeinflusst werden. In einem Mikroskop ist die Beeinflussung aufgrund der Wirkung der folgenden Faktoren nötig, wodurch die Pulslänge durch der Einfluss am Ort der Probe meist nicht mehr bandbreitenbegrenzt ist, d.h. längere Pulse auftreten:

- Durch die Glasmaterialien aus denen die optischen Elemente im Mikroskop gefertigt sind. Eine Kompensation kann hier stationär erfolgen.
- Durch das Präparat an sich. Die Pulsverlängerung ist hier abhängig von der Eindringtiefe in das Präparat. Weiterhin wird die Pulsverbreiterung durch Dispersionen höherer Ordnung erzeugt. Deshalb muss hier die Kompensation für jede spektrale Komponente einzeln und in Echtzeit erfolgen.

- Durch die Änderung der Wellenlänge
- Durch die Änderung der mittleren Leistung, falls zusätzliche nichtlineare Prozesse wie Selbstphasen Modulation in Glasfasern auftreten.

Die Verwendung eines SLM ist deshalb besonders vorteilhaft und es kann wie bereits  
5 oben beschrieben die Einstellung der Phasen der räumlich separierten Anteile  
zueinander flexibel durch einzeln ansteuerbare Elemente (vorteilhaft in Matrixform)  
erfolgen. Die Ansteuerung der Elemente erfolgt in Abhängigkeit von den o.g. Größen  
durch die Regelung vorteilhaft in Echtzeit, wobei als Messgröße beispielsweise ein  
Zweiphotonen-Fluoreszenzsignal, das in der Probe T angeregt wird, fungiert. Durch die  
10 entsprechende Regelung wird in den meisten Fällen eine Optimierung der Pulslänge  
am Ort der Probenwechselwirkung erreicht.

Weiterhin sind die Wechselwirkungsquerschnitte der verwendeten Farbstoffe abhängig  
von dem zeitlichen Verhalten der Lichtpulse. Somit ist es möglich das  
15 Fluoreszenzsignal für einzelne Farbstoffe zu optimieren, wobei die Fluoreszenz anderer  
Farbstoffe gleichzeitig unterdrückt wird. Es besteht also die Möglichkeit durch die  
Rückkopplung der Messgröße (hier das Zweiphotonen-Fluoreszenzsignal) das zeitliche  
Verhalten der Lichtpulse durch Phasen- oder Amplitudenmodulation so einzustellen,  
dass die entsprechende Messgröße optimiert wird.

20 In Fig.3a und 4a sind beispielhaft Anordnungen für die Einheit zur spektral räumlichen  
Aufspaltung der Spektralkomponenten der Lichtquelle DISP, d.h. für D1 und D2  
beschrieben. Fig. 3 zeigt zwei Axicons A1, A2, wobei A1 beispielsweise von der Spitze  
her beleuchtet wird. Die Axicons sind so angeordnet und ausgebildet, dass das erste  
25 Axicon eine Winkeldispersion einführt, die vom zweiten Axicon wieder kompensiert  
wird, so dass in Strahlrichtung nach dem zweiten Axicon wieder ein Parallelstrahl  
vorliegt.

Das heißt vorzugsweise, daß D2 so aufgebaut ist, daß es mit D1 zusammen eine  
Planplattenwirkung hat, im konkreten Fall heißt das, daß D1 eine Planplatte mit einer  
30 prismatischen oder axiconförmigen Ausnehmung aufweist, in die D2 (theoretisch)  
hineinpaßt und mit D1 eine Planplatte bildet.

Die Axicons können aus prismatisch geschliffenen Glasplatten (refraktive Elemente)  
oder zur Erhöhung der Winkeldispersion aus diffraktiven Elementen z.B. ringförmigen



Gitterstrukturen bestehen. Zur Definition des Axicon wird insbesondere auf <http://www.sciner.com/Opticsland/axicon.htm> verwiesen.

Fig. 4 zeigt eine Anordnung mit zwei Prismen P1, P2, wobei P1 beispielsweise von der Spitze her beleuchtet wird. ausgebildet, dass das erste Prisma wiederum eine Winkeldispersion einführt, die vom zweiten Prisma kompensiert wird, so dass in Strahlrichtung nach dem zweiten Prisma wieder ein Parallelstrahl vorliegt.

Zum Aufbau siehe Bemerkungen zu Fig.3.

In Fig. 3b, 4b ist jeweils die Strahlverteilung vor dem ersten Element und in 3c, 4c nach dem zweiten Element dargestellt.

Bei Verwendung von Prismen liegen die Spektralanteile I1, I2.... aufgespalten nebeneinander in einer Zeile, bei Verwendung von Axicons ringförmig in mehreren Ebenen, wobei jede Spektralkomponente einen bestimmten Ring ausfüllt.

Mit den Pfeilen S1, S2 ist eine über eine nicht dargestellte Steuereinheit angesteuerte ggf. auch gekoppelte Bewegung der beiden dispersiven Elemente zueinander bzw. voneinander weg angedeutet. Diese Verschiebung bewirkt neben der bereits erläuterten Anpassung der Strahlaufweitung zusätzlich eine Änderung der Pulslänge am Ort der Probe T (siehe z.B. DE 19744302A1, DE19930532A1, ohne Aufhebung der räumlichen Separierung).

Erfindungsgemäß kann die beschriebene Einstellung der Pulsform zusätzlich auch in Verbindung mit anderen Steuerfunktionen des Mikroskops, beispielsweise zur Veränderung der spektralen Zusammensetzung der Beleuchtung und/ oder der Intensität (DE19829981A1) während der Bildaufnahme für bestimmte Probenbereiche, erfolgen. Die Steuerung erfolgt über die zentrale Ansteuereinheit des Mikroskops.

Bei einer Änderung der Mittenwellenlänge der Lichtquelle kann eine vorgespeicherte Neueinstellung der Elemente D1 und D2 zueinander erfolgen.

In Fig. 5 ist eine weitere Ausbildung der Einheit DISP mit Geradsichtprismen GP, die auch Amici-Prismen genannt werden, dargestellt. Das Geradsichtprisma erzeugt hierbei eine feste nicht einstellbare räumliche Aufspaltung der Spektralkomponenten der Lichtquelle und damit auch eine feste Strahlaufweitung. Die Spektralkomponenten der Lichtpulse sind im Anschluss wieder räumlich parallel ausgerichtet.

Vorteilhaft bei dieser Anordnung der DISP ist, dass eine hohe Transmission und ein mechanisch stabiler Aufbau besonders einfach realisiert werden kann.

Fig.6 zeigt einer weitere Anordnung mit zwei Transmissionsgittern. Der Strahlverlauf ist im wesentlichen äquivalent der Anordnung aus Abb. 4. Durch den Einsatz der Gitter  
5 kann jedoch die Winkeldispersion erhöht werden. Bei Verwendung von Gittern ergibt sich zusätzlich auf der optischen Achse die nullte Beugungsordnung des Gitters, die in der Abbildungen mit 0 bezeichnet ist.

Die erste Beugungsordnung nach dem ersten Transmissionsgitter geht in die negative Beugungsordnung des zweiten Gitters ein. Die Winkeldispersion wird dadurch  
10 aufgehoben, die Strahlen bleiben aber räumlich getrennt.

Neben den in den Figuren 3 bis 6 gezeigten Anordnungen zur beispielhaften Ausbildung der Elemente D1 und D2 können prinzipiell auch reflektierende Elemente wie Reflexionsgitter oder Elemente die neben der Winkeldispersion auch eine Ablenkung einführen (wie z.B. Dispersionsprismen – Teilbild A oder Reflexionsgitter –  
15 Teilbild B) eingesetzt werden (siehe auch DE19744302A1).

Figur 11 zeigt solche Anordnungen schematisch. Bei diesen Anordnungen muss, bei einer Änderung der Mittenwellenlänge nicht nur die dispersiven Elemente selbst D1 und D2 relativ zueinander bewegt werden sondern entweder der Strahlengang ab der Lichtquelle LQ bis einschließlich D1 oder D2 bis einschließlich der Probe T. Die  
20 Bewegung B erfolgt wie durch Pfeile angedeutet, hierbei senkrecht zur optischen Achse, die ausgehend von der Lichtquelle gebildet wird.

Figur 7 zeigt die auf eins normierte laterale Intensitätsverteilung im Fokus, d.h. am Ort der Probe T. Eingezeichnet ist die Referenzverteilung (1) für eine Beleuchtung nach dem Stand der Technik, wobei alle Spektralkomponenten der Lichtquelle die Pupille der  
25 in die Probe fokussierenden Optik gleichmäßig ausleuchten.

Zum Vergleich ist die Intensitätsverteilung für eine Beleuchtung der Pupille mit einer erfindungsgemäßen Anordnung nach Fig. 3 eingezeichnet (2). Zu erkennen ist, dass die Kurve (2) nur unwesentlich von der Referenzkurve (1) abweicht und somit insbesondere in einem Multiphotonenmikroskopie eine vergleichbare optische  
30 Auflösung erzielbar ist.

Figur 8 zeigt die auf eins normierte Intensitätsverteilung im Fokus und auf der optischen Achse in Abhängigkeit von der Zeit (Pulsverteilung) beispielhaft für die Ausbildung der Elemente D1 und D2 nach Fig. 3. P1 stellt die Pulsverteilung am Laserausgang dar. P2

ist die Pulslänge zwischen dem dispersiven Element D1 und der Probe T. In der Kurve P3 ist die Pulsverteilung am Ort der Probe T dargestellt. Man erkennt, dass zwischen dem Element D1 und der Probe T eine (im gezeigten Zeitfenster) nahezu konstante Laserintensität mit folglich geringer Spitzenintensität vorliegt. Somit sind in diesem Bereich die Pulsspitzenleistungen gering. Jedoch am Ort der Probe, d.h. nach der räumlichen Überlagerung der Spektralkomponenten ergibt sich eine Pulsverteilung, die nahezu identisch der Pulsverteilung am Laserausgang ist.

Figur 9 zeigt schematisch eine weitere Anordnung in einem Laser Scanning Mikroskop. Sie ist im wesentlichen identisch zur Anordnung gemäß Figur 2. Jedoch ist zwischen der Lichtquelle LQ und dem ersten dispersiven Element D1 eine single mode Glasfaser (FIBER) mit zwei Optiken zur Einkopplung in die Glasfaser und ein zusätzliches dispersives Element D vorgesehen. Das dispersive Element kann im einfachsten Falle ein Block mit einem hoch dispersiven Glasmaterial oder Kristall wie TeO<sub>2</sub> sein. In diesem Falle ist jedoch beispielsweise am Ort PP eine entsprechende Kompensation der Gesamtdispersion GVD der optischen Anordnung zwischen Lichtquelle LQ und Probe T vorzusehen. Die dispersive Einheit D kann auch einstellbar gemäß DE19744302A1, DE19930532A1, ausgebildet werden. Hierbei kann dann die Phasenplatte bzw. flexible Einheit am Ort PP entfallen, da dann die Einheit D die gesamte Kompensation der GVD vornehmen kann. Vorteilhaft bei den Anordnungen gemäß Fig. 9 ist, dass die durch die Elemente D1 und D2 eingefügte GVD entsprechend zur Kompensation der Selbstphasenmodulation SPM, die bei hohen Intensitäten in der Glasfaser auftreten kann, genutzt werden kann. Besonders vorteilhaft bei der hier beschriebenen Anordnung ist, dass die Dispersion verursacht durch die Elemente D1 und D2 wesentlich höher gewählt werden kann. Hierdurch erhöht sich die durch die Glasfaser koppelbare mittlere Leistung und damit die am Ort der Probe T erzielbare Spitzenintensität. Für eine Beschreibung des Zusammenspiels der Wirkungen von D, FIBER und D1/D2 wird auf DE19827239A1 verwiesen.

Figur 10 zeigt einen weiteren Aufbau eines Laser Scanning Mikroskops mit einer Glasfaser. Hierbei befindet sich im Gegensatz zu Fig. 9 ein Glasfaserbündel FB zwischen den Elementen D1 und D2. In die Glasfasern wird das Licht mit Hilfe von 2 Linsen L1 und L2 ein- bzw. ausgekoppelt. Im einem Brennpunkt der Linsen L1 und L2 befinden sich jeweils die Glasfasern und im verbleibenden die dispersiven Elemente D1

und D2. Die Brennweiten der Linsen müssen nicht identisch sein. Jedoch muss bei ungleicher Wahl der Brennweite das Gitter D2 entsprechend angepasst werden. Die Geometrie des Faserbündels ergibt sich aus der Wahl der dispersiven Elemente D1 und D2. Wird beispielsweise ein Element entsprechend Fig. 3 verwendet, dann muss  
5 das Faserbündel einen kreisförmigen Querschnitt entsprechend 10a ausweisen. Bei Verwendung von Elementen entsprechend Fig. 4 bis 6 müssen die einzelnen Fasern in einer Reihe im Faserbündel angeordnet werden. Fig. 10a/b zeigt schematisch Faserbündel, wobei beispielhaft einzelne Fasern schwarz eingezeichnet sind. Vor den  
10 einzelnen Fasern können auch Mikrolinsen zu effizienteren Einkopplung in die Faser angeordnet werden.

Aufgrund der Wirkung von D1 werden in jede Faser nur bestimmte Spektralbereiche eingekoppelt, so dass die Faser keine oder nur sehr lange Pulse und damit nur geringe Pulsspitzenleistungen bzw. Pulsspitzenintensitäten sieht, die sonst zu schädlichen  
15 Effekten insbesondere in den Glasfasern führen können. Somit können durch die Fasern wesentlich höhere mittlere Leistungen ohne Veränderung der Pulsform geleitet werden.

Die aus dem Glasfaserbündel ausgekoppelten Spektralkomponenten werden mit L2 kollimiert, wobei sich die einzelnen Spektralanteile als Parallelbündel schneiden. Die verbleibende Winkeldispersion wird mit D2 wieder aufgehoben, wobei die  
20 Spektralkomponenten noch räumlich separiert bleiben. Die folgenden Optiken entsprechen den bereits anhand von Fig. 2 erläuterten Komponenten. Mit Hilfe der Verschiebung S2 entlang der optischen Achse kann wiederum die Ausleuchtung der in die Probe fokussierenden Optik angepasst werden.

Die Kompensation der Laufzeitunterschiede der einzelnen Spektralkomponenten und  
25 der Gruppengeschwindigkeitsdispersion GVD der Lichtpulse erfolgt mit Hilfe von PP vorzugsweise mit einer flexiblen Einheit (SLM) mit ansteuerbaren Elementen in linienförmiger oder matrixförmiger Anordnung.

Durch die beschriebene Anordnung eines Glasfaserbündels entsteht eine neuartige vorteilhafte Anordnung mit einem Modul, bestehend aus der Lichtquelle, der spektralen  
30 Aufspaltung D1 und der Einkopplung in die Fasern und hinter dem Faserbündel dem Mikroskopmodul mit dem zweiten dispersiven Element D2, die auf diese Weise voneinander entkoppelt sind und einzeln austauschbar gestaltet werden können.

**Patentansprüche****1.**

Verfahren zur optischen Untersuchung und/ oder Bearbeitung einer Probe,  
mit einer Erzeugung eines kurzpulsigen Beleuchtungslichtes,

- 5 einer spektralen Aufspaltung des Beleuchtungslichtes zur Erzeugung räumlich  
getrennter Spektralkomponenten mit Pulslängen, die größer sind als die Pulslänge der  
Beleuchtungslichtquelle,  
dem Durchlaufen der Spektralkomponenten durch eine Übertragungsoptik in Richtung  
der Probe,  
10 der Fokussierung des Beleuchtungslichtes auf oder in die Probe, wobei die  
Spektralkomponenten überlagert werden  
sowie der Detektion des Probenlichtes

**2.**

Verfahren nach Anspruch 1,

- 15 wobei die räumlich getrennten Spektralkomponenten in ein Parallelstrahlbündel  
überführt werden.

**3.**

Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,

- wobei die Pulslänge der auf oder in die Probe fokussierten Spektralkomponenten  
20 kleiner ist als die Pulslänge der räumlich separierten Spektralkomponenten.

**4.**

Anordnung zur optischen Untersuchung und/ oder Bearbeitung einer Probe  
bestehend aus:

Mitteln zur Erzeugung eines Beleuchtungslichtes ,

- 25 diesen nachgeordnete Mittel zur spektralen Aufspaltung des Beleuchtungslichtes zur  
Erzeugung räumlich getrennter Spektralkomponenten ,

Mittel zur Parallelisierung des aufgespaltenen Beleuchtungslichtes,

Mittel zur Fokussierung des Beleuchtungslichtes auf oder in die Probe, wobei die  
Spektralkomponenten überlagert werden sowie Mitteln zur Detektion des Probenlichtes.

5.

Anordnung zur optischen Untersuchung und / oder Bearbeitung einer Probe.  
bestehend aus:

Mitteln zur Erzeugung eines kurzpulsigen Beleuchtungslichtes,

5 diesen nachgeordneten Mitteln zur spektralen Aufspaltung des Beleuchtungslichtes zur Erzeugung räumlich getrennter Spektralkomponenten mit Pulslängen, die größer sind als die Pulslänge der Beleuchtungslichtquelle,  
einer Übertragungsoptik zur Übertragung der Spektralkomponenten in Richtung der Probe,

10 Mitteln zur Fokussierung des Beleuchtungslichtes auf oder in die Probe, wobei die Spektralkomponenten überlagert werden.

Mitteln zur Detektion des Probenlichtes.

6.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei Mittel zur  
15 Überführung der räumlich getrennten Spektralkomponenten in ein Parallelstrahlbündel vorgesehen sind .

7.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die Pulslänge der auf oder in die Probe fokussierten Spektralkomponenten  
20 kleiner ist als die Pulslänge der räumlich separierten Spektralkomponenten.

8.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei zwischen der Lichtquelle und den Mitteln zur spektralen Aufspaltung  
vorzugsweise einstellbare Dispersionsmittel vorgesehen sind.

25 9.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei eine Ein- und Auskopplung der Parallelstrahlbündel in ein Glasfaserbündel  
erfolgt.

10.

30 Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei eine die spektrale Aufspaltung durch mindestens ein Prisma und/ oder Axicon  
und/ oder Transmissionsgitter und / oder Reflektionsgitter erfolgt.

11.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Überführung in ein Parallelstrahlbündel durch ein weiteres Prisma, oder ein weiteres Axicon oder ein weiteres Gitter erfolgt.

5 12.

Anordnung nach Anspruch 11, wobei wobei ein erstes und zweites Prisma oder Axicon so aufgebaut sind, daß sie gemeinsam eine Planplattenwirkung aufweisen.

13.

10 Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei ein Geradsichtprisma zur Aufspaltung und Parallelisierung vorgesehen ist

14.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei vorzugsweise im parallelen Strahlengang ein Kompensationselement zur

15 Beeinflussung der Komponenten vorgesehen ist

15.

Anordnung nach Anspruch 14, wobei eine einstellbare Beeinflussung der Komponenten durch

wechselbare optische Elemente mit unterschiedlichem Querschnittsverlauf und/ oder

20 einen Spatial Light Modulator (SLM) erfolgt.

16.

Verwendung einer Anordnung gemäß mindestens einem der vorangehenden Ansprüche in einem Fluoreszenzmikroskop.

17.

25 Verwendung einer Anordnung gemäß mindestens einem der vorangehenden Ansprüche in einem Multiphotonenmikroskop.

18.

Verwendung einer Anordnung gemäß mindestens einem der vorangehenden Ansprüche in einem Laser Scanning Mikroskop.

30 19.

Verwendung einer Anordnung gemäß mindestens einem der vorangehenden Ansprüche in der nichtlinearen Laserrastermikroskopie.

**20.**

Verwendung einer Anordnung gemäß mindestens einem der vorangehenden Ansprüche bei der Materialbearbeitung.

**21.**

- 5 Verwendung einer Anordnung gemäß mindestens einem der vorangehenden Ansprüche bei der Bearbeitung biologischen Gewebes.

**22.**

Verwendung einer Anordnung gemäß mindestens einem der vorangehenden Ansprüche bei der Bearbeitung der Augenhornhaut.

10

15

20

25

30



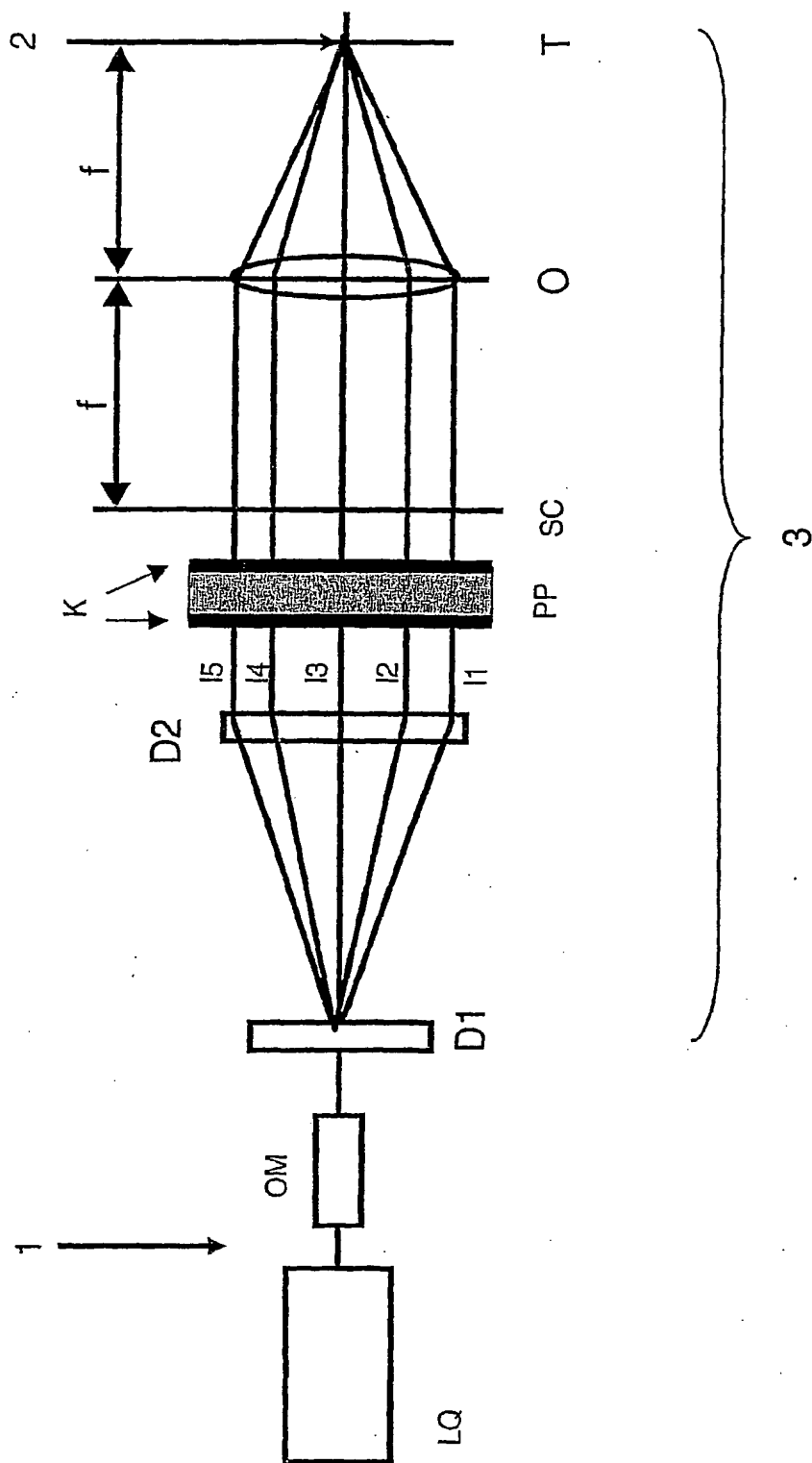


Fig. 1

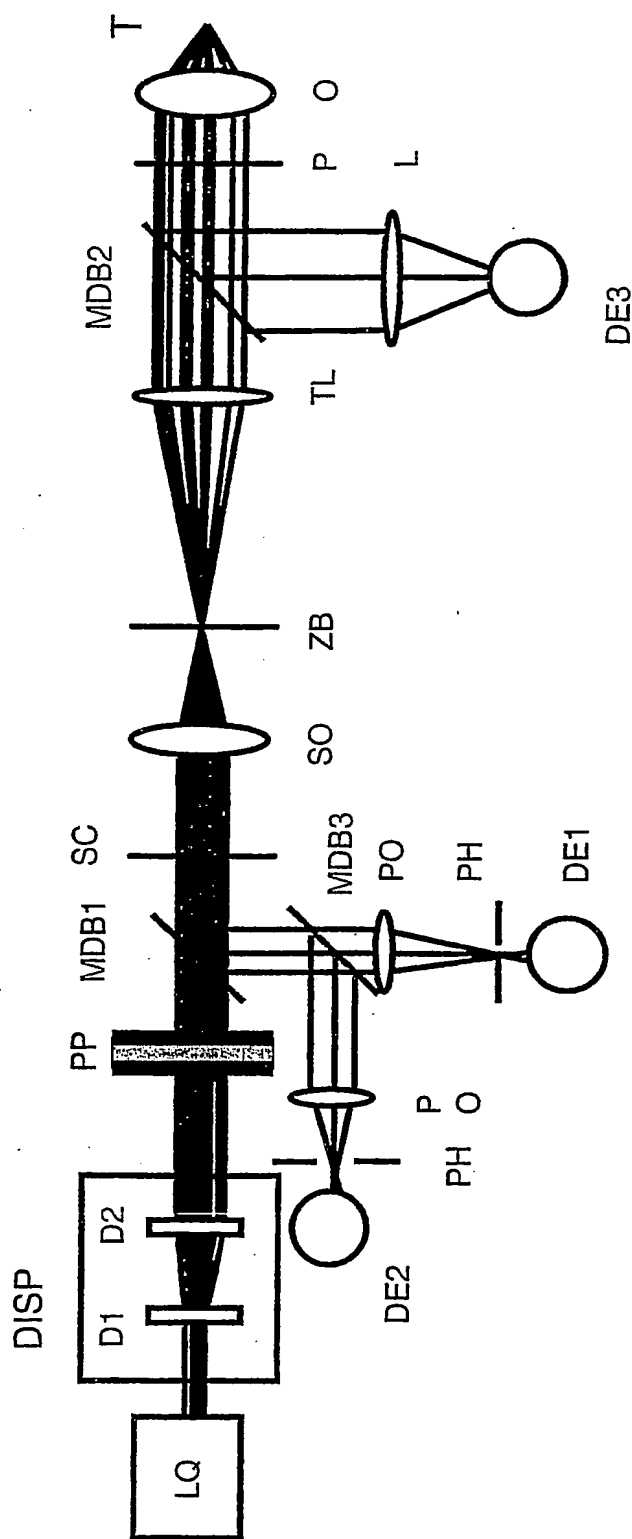


Fig: 2

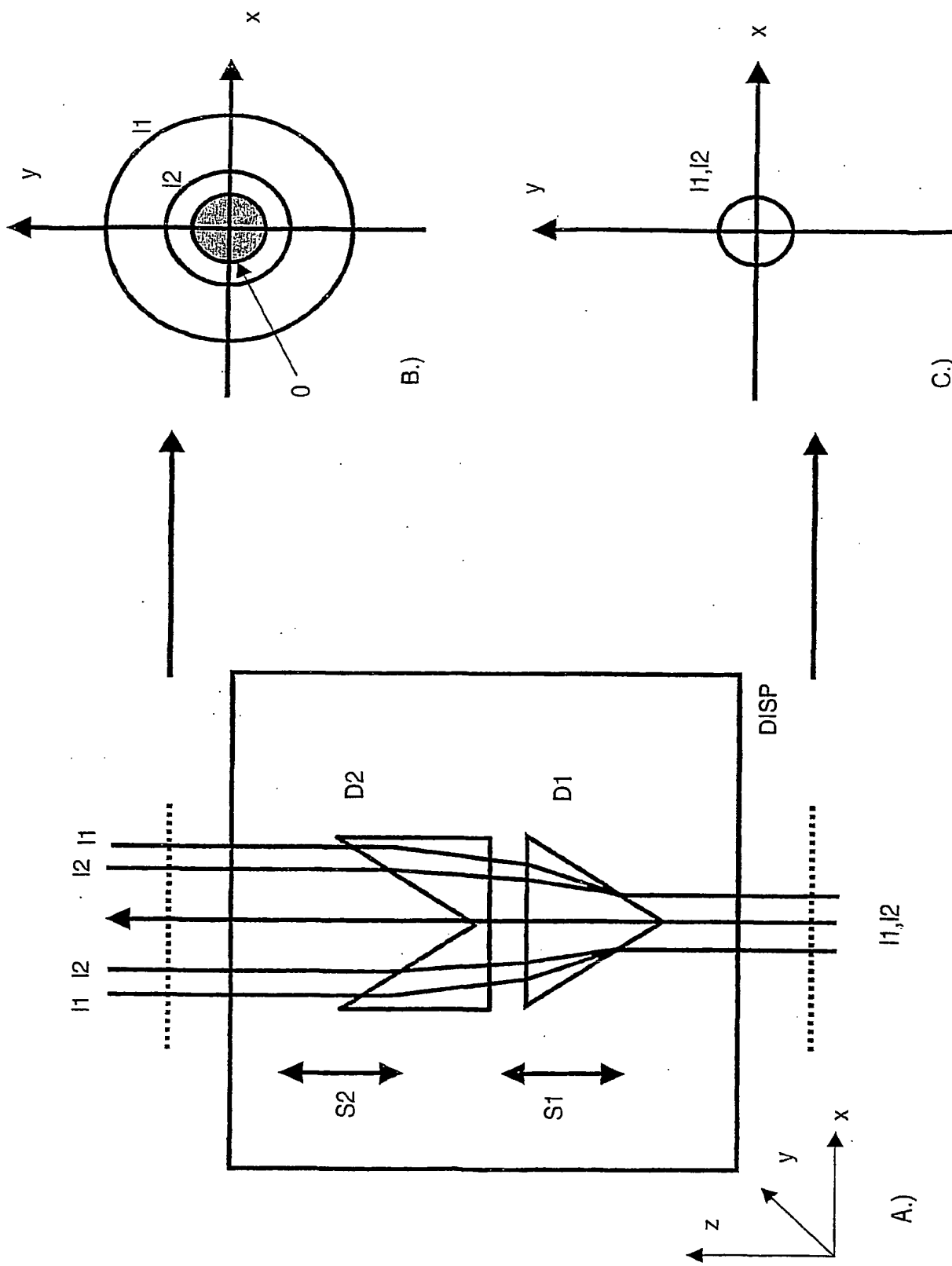


Fig: 3

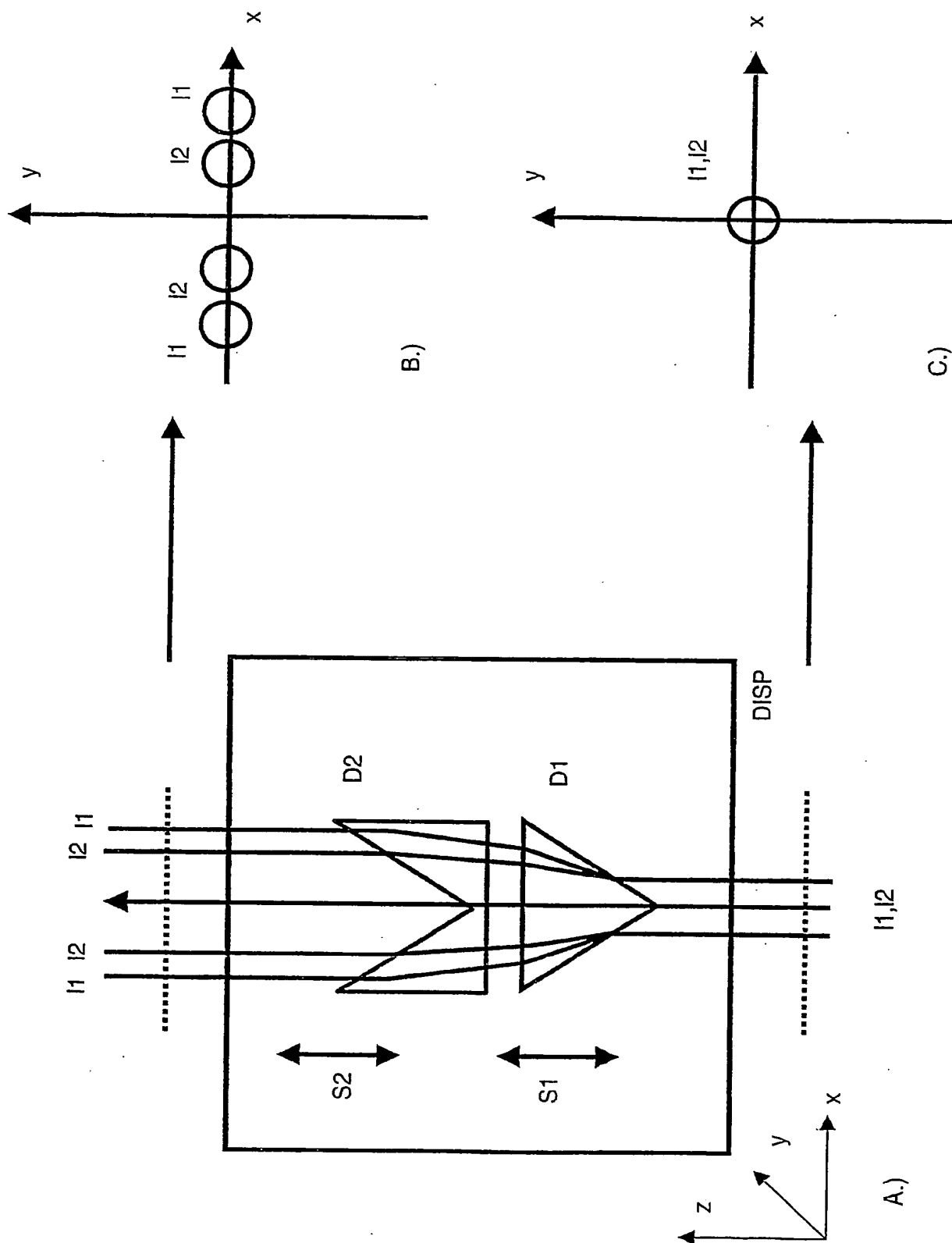


Fig: 4

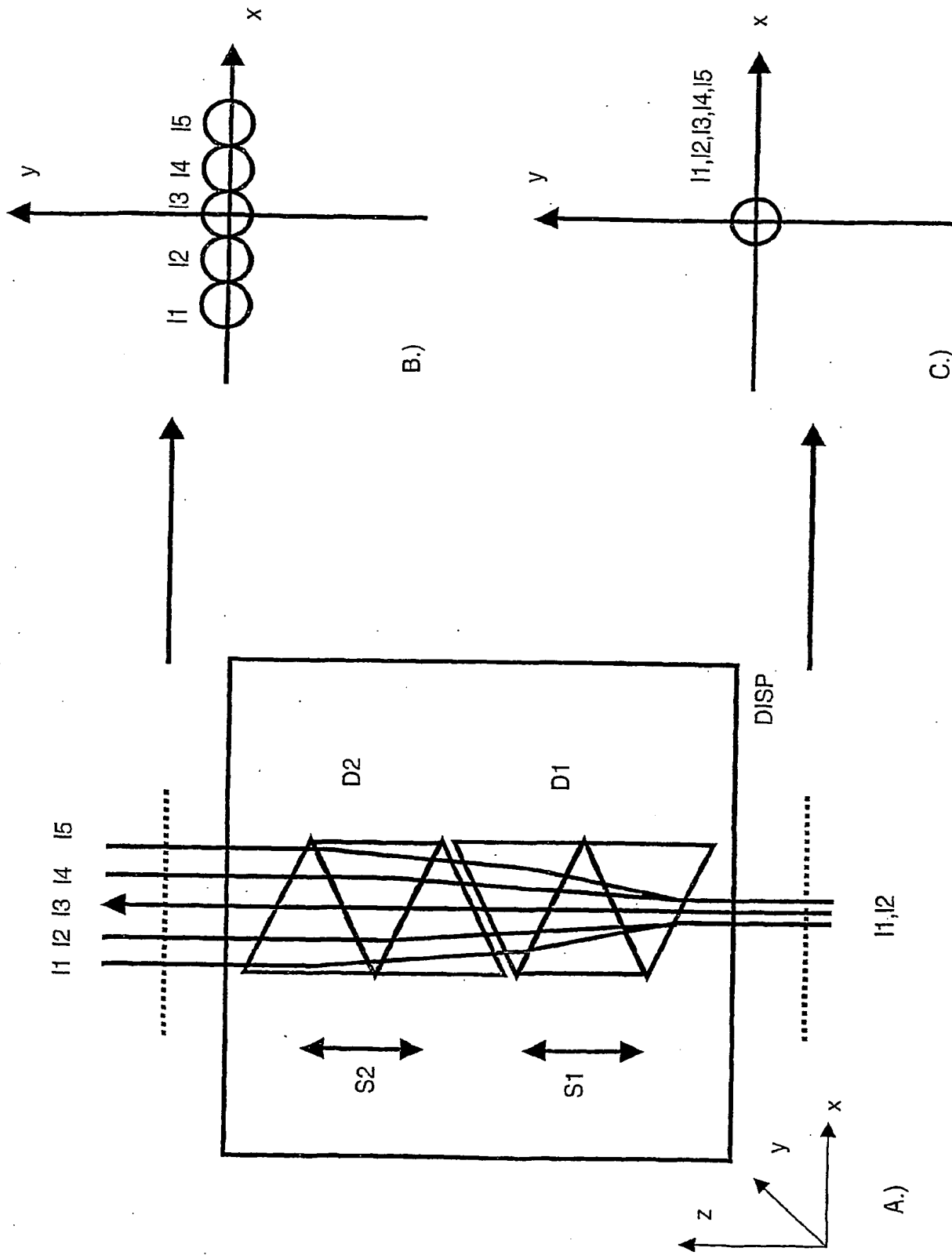


Fig: 5

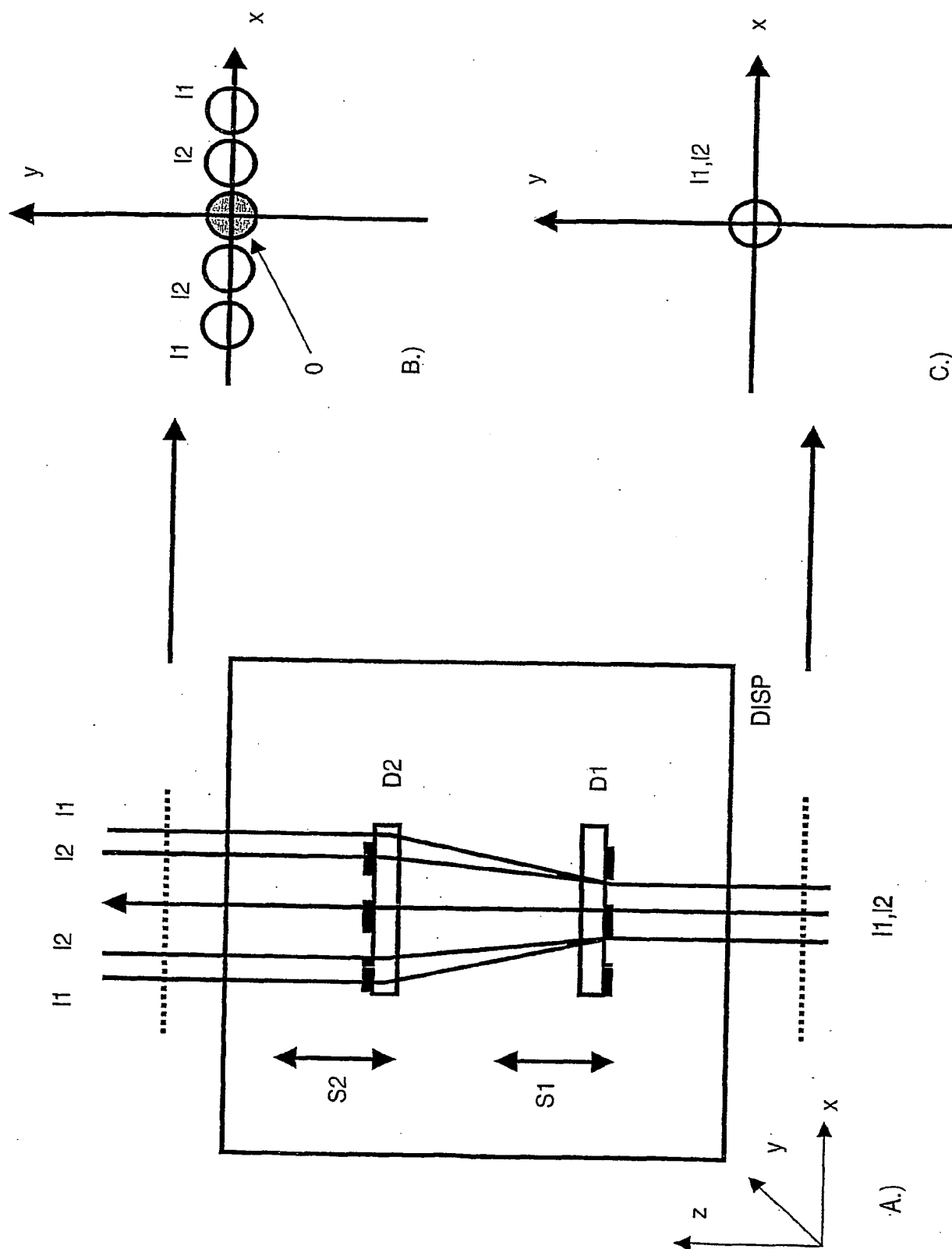


Fig. 6

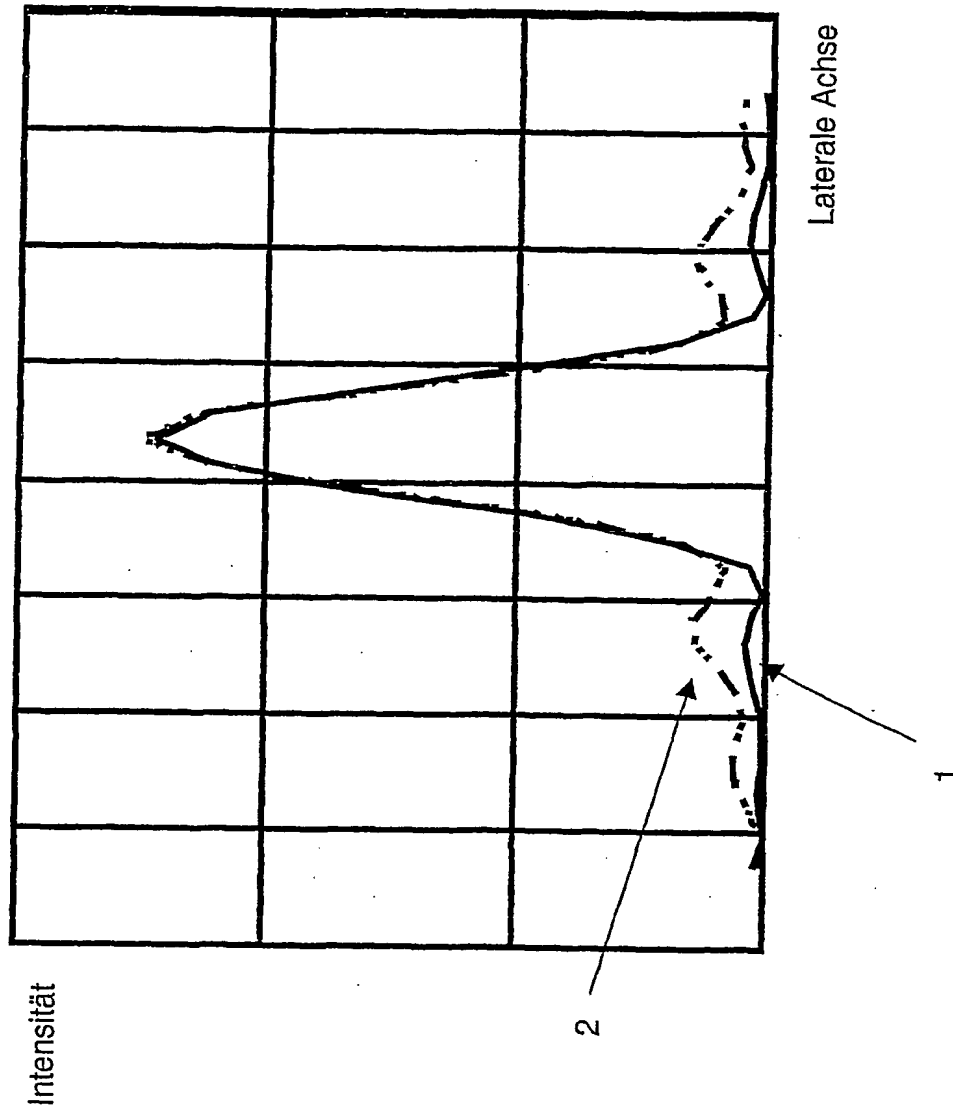


Fig: 7

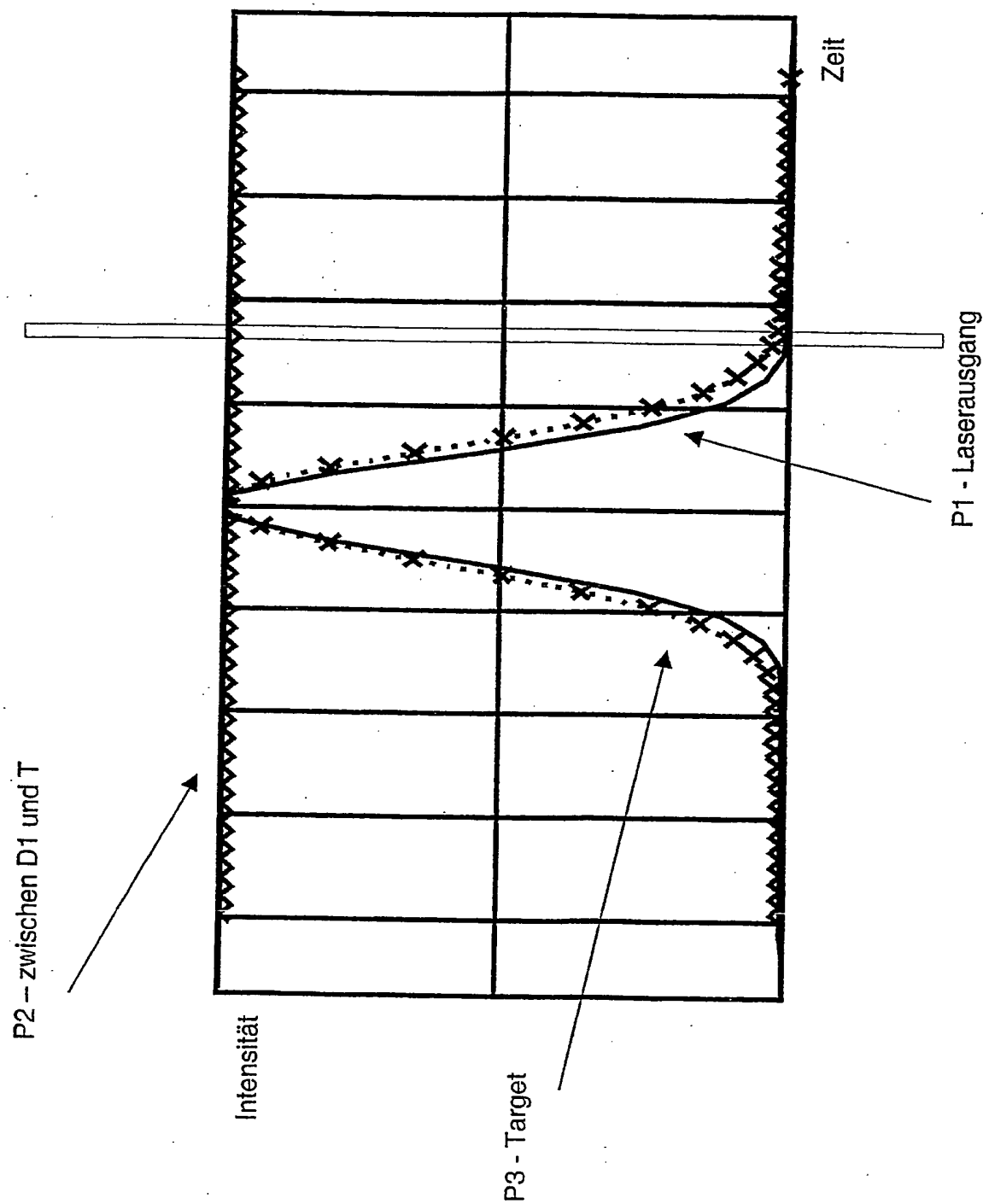


Fig: 8



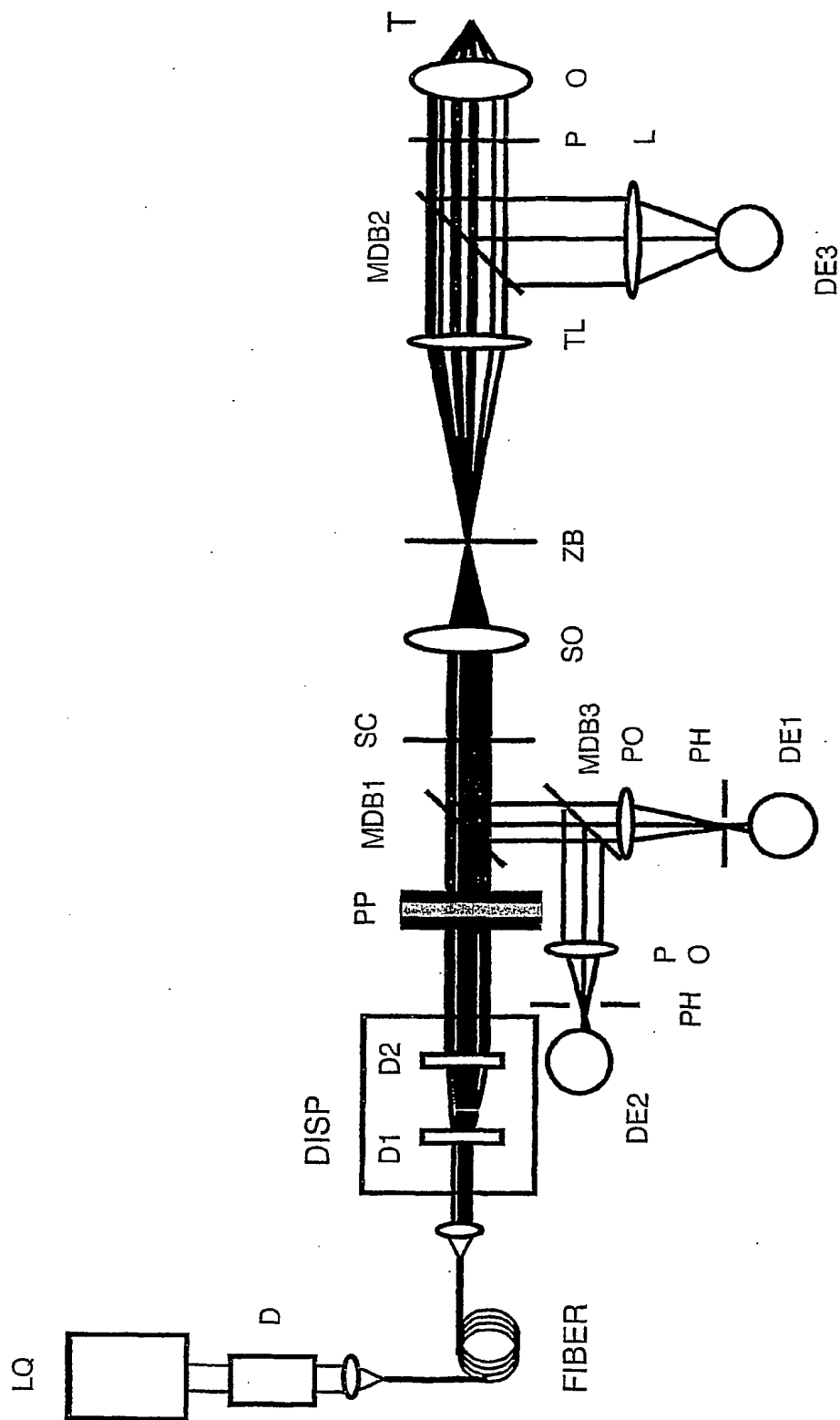


Fig. 9

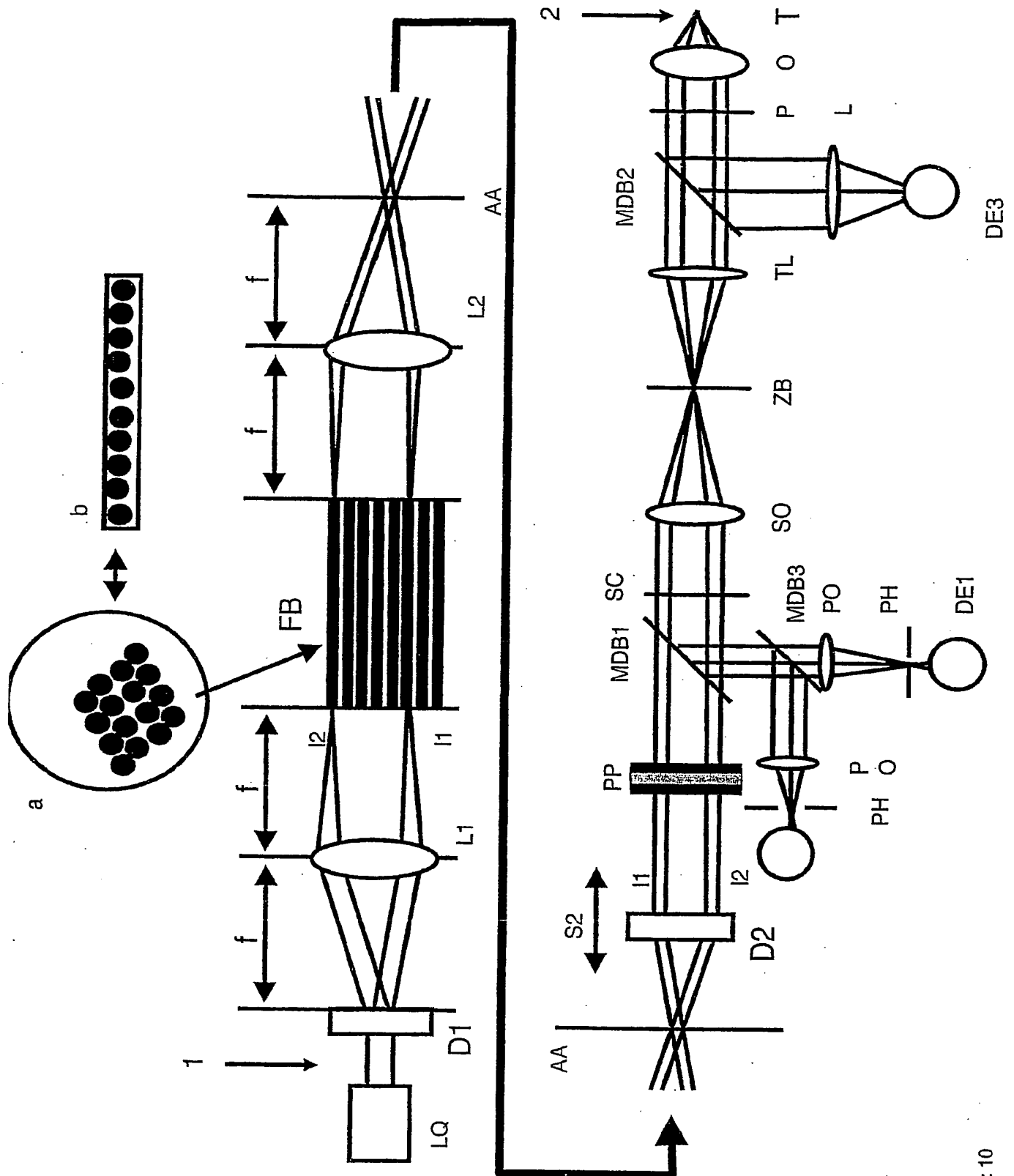


Fig. 10

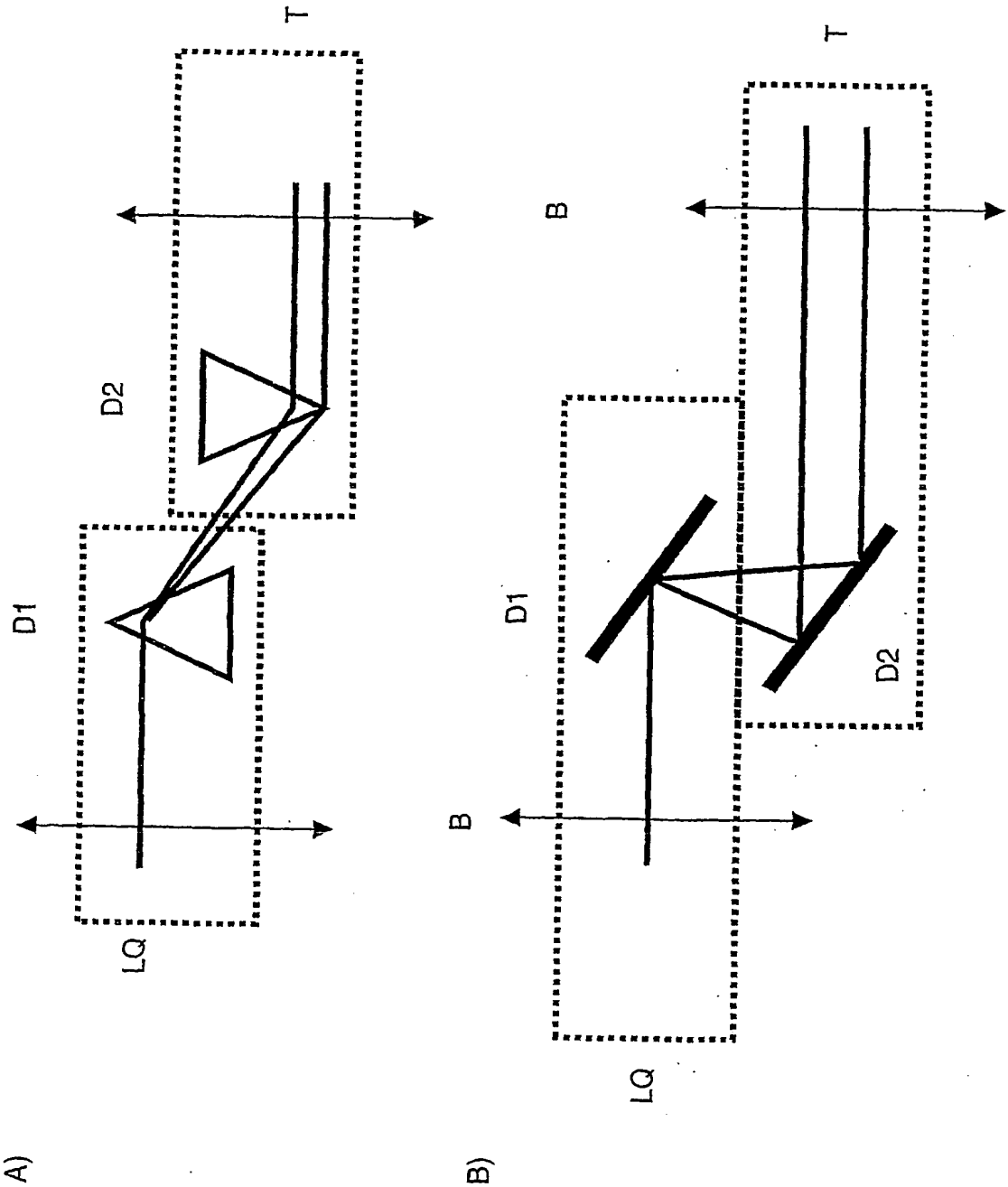


Fig. 11

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/13476

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 G02B21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 196 22 359 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 11 December 1997 (1997-12-11) the whole document	1-13, 16-22
X	EP 1 143 282 A (LEICA MICROSYS HEIDELBERG GMBH) 10 October 2001 (2001-10-10) paragraph '0003!; figures 2,3	4, 14, 15
X	US 5 583 342 A (ICHIE KOJI) 10 December 1996 (1996-12-10) figures 7,10-12	1-13, 16-22
A	SU 1 439 519 A (BRITVIN VLADIMIR V) 23 November 1988 (1988-11-23) figure 1	12, 13
A	US 5 648 866 A (HAYDEN CARL ET AL) 15 July 1997 (1997-07-15) figures 4,8,11	12, 13

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 March 2004

Date of mailing of the international search report

18/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scheu, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/13476

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19622359	A	11-12-1997	DE 19622359 A1	11-12-1997
			DE 19744302 A1	15-04-1999
			JP 10068889 A	10-03-1998
			JP 11218490 A	10-08-1999
			US 6178041 B1	23-01-2001
EP 1143282	A	10-10-2001	DE 10016361 A1	11-10-2001
			EP 1143282 A2	10-10-2001
			JP 2001324686 A	22-11-2001
			US 2001043403 A1	22-11-2001
US 5583342	A	10-12-1996	US 5796112 A	18-08-1998
			DE 69418248 D1	10-06-1999
			DE 69418248 T2	14-10-1999
			EP 0627643 A2	07-12-1994
			JP 8015156 A	19-01-1996
			JP 2931268 B2	09-08-1999
			JP 10062694 A	06-03-1998
SU 1439519	A	23-11-1988	SU 1439519 A1	23-11-1988
US 5648866	A	15-07-1997	US 5710658 A	20-01-1998

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Anzeichen

PCT/EP 03/13476

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 G02B21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 G02B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 196 22 359 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 11. Dezember 1997 (1997-12-11) das ganze Dokument	1-13, 16-22
X	EP 1 143 282 A (LEICA MICROSYS HEIDELBERG GMBH) 10. Oktober 2001 (2001-10-10) Absatz '0003!; Abbildungen 2,3	4, 14, 15
X	US 5 583 342 A (ICHIE KOJI) 10. Dezember 1996 (1996-12-10) Abbildungen 7, 10-12	1-13, 16-22
A	SU 1 439 519 A (BRITVIN VLADIMIR V) 23. November 1988 (1988-11-23) Abbildung 1	12, 13
A	US 5 648 866 A (HAYDEN CARL ET AL) 15. Juli 1997 (1997-07-15) Abbildungen 4, 8, 11	12, 13

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. März 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18/03/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Scheu, M

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Anzeichen

PCT/EP 03/13476

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19622359 A	11-12-1997	DE 19622359 A1	11-12-1997
		DE 19744302 A1	15-04-1999
		JP 10068889 A	10-03-1998
		JP 11218490 A	10-08-1999
		US 6178041 B1	23-01-2001
EP 1143282 A	10-10-2001	DE 10016361 A1	11-10-2001
		EP 1143282 A2	10-10-2001
		JP 2001324686 A	22-11-2001
		US 2001043403 A1	22-11-2001
US 5583342 A	10-12-1996	US 5796112 A	18-08-1998
		DE 69418248 D1	10-06-1999
		DE 69418248 T2	14-10-1999
		EP 0627643 A2	07-12-1994
		JP 8015156 A	19-01-1996
		JP 2931268 B2	09-08-1999
		JP 10062694 A	06-03-1998
SU 1439519 A	23-11-1988	SU 1439519 A1	23-11-1988
US 5648866 A	15-07-1997	US 5710658 A	20-01-1998